

Roberta D'Agata^a, Roberto Corradini^b,
Rosangela Marchelli^b, Giuseppe Spoto^{a,c}

^aDipartimento di Scienze Chimiche
Università di Catania

^bDipartimento di Chimica Organica ed Industriale
Università di Parma

^cIstituto Biostrutture e Bioimmagini
CNR - Catania

gspoto@dipchi.unict.it

SPRI E ACIDI PEPTIDO NUCLEICI: RIVELAZIONE ULTRASENSIBILE DI DNA

In questo lavoro proponiamo l'applicazione del Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI) nella rivelazione di DNA attraverso l'uso di sonde di acidi peptido-nucleici. L'amplificazione del segnale SPRI, ottenuta facendo uso di nanoparticelle metalliche opportunamente funzionalizzate, consente il riconoscimento di sostituzioni di singoli nucleotidi con elevata sensibilità. Inoltre, il ricorso a strategie basate sulla microfluidica si dimostra utile al fine di condurre indagini SPRI simultanee di più analiti con un ridotto consumo di campione.

Le indagini dei profili di espressione genica definiscono un'area di grande impatto sia in campo biomedico, con particolare riferimento alla diagnosi di malattie sviluppate su base genetica, che in ambito alimentare, per l'identificazione e la tracciabilità delle materie prime, come nel caso delle analisi di organismi geneticamente modificati (OGM) [1, 2]. In questo settore, uno degli obiettivi più ambiziosi è la messa a punto di metodi altamente sequenza-specifici in grado di rivelare differenze anche di una singola nucleobase, come quelle presenti in mutazioni puntiformi o in polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs). La riduzione della complessità delle procedure analitiche utilizzate per condurre i suddetti studi, delle possibili fonti di contaminazione e dei costi e tempi richiesti rappresentano alcune tra le principali sfide affrontate dalla moderna genomica.

Gli approcci analitici più tradizionalmente utilizzati per la rivelazione veloce e parallela di DNA fanno riferimento alle tecniche di PCR Real-Time [3] e alla tecnologia dei DNA microarray [4], realizzati immobilizzando su superfici sonde di oligonucleotidi a sequenza nota. In entrambi i casi si opera un'amplificazione del campione di DNA (tar-

get) mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR), in conseguenza alle basse concentrazioni a cui, di norma, il target è disponibile, accoppiato alla rivelazione del DNA target mediante un marcatore, spesso fluorescente, utile per rivelare l'avvenuta reazione di ibridazione tra un'opportuna sonda e il DNA target. La necessità di amplificazione e la marcatura con gruppi reporter costituiscono dei limiti in quanto possibili fonti di contaminazioni ed errori oltre che motivo di lievitazione dei costi e tempi d'analisi. Risulta quindi auspicabile il poter disporre di tecnologie alternative che siano sufficientemente sensibili da non dover richiedere l'amplificazione del DNA e che non ricorrano all'uso di marcatori (label-free). Le normali tecniche di rivelazione disponibili (che spaziano da sistemi elettrochimici a quelli ottici a quelli meccanici) hanno limiti di rivelazione che arrivano comunemente nel range nanomolare e si prestano alla rivelazione di DNA dopo amplificazione con PCR, mentre la rivelazione diretta del DNA genomico richiederebbe di scendere a concentrazioni almeno femtomolari (Fig. 1), mantenendo la capacità di discriminare fra il DNA target e sequenze diverse [5].

La Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI) [6] è una tecnica spettroscopica capace di investigare, senza far uso di marcatori, le interazioni molecolari che si instaurano all'interfaccia di una superficie metallica. Uno dei vantaggi associati a tale tecnica deriva dalla possibilità di studiare in parallelo le interazioni che si instaurano con superfici sulle quali si sia realizzato un ancoraggio spazialmente differenziato di un numero variabile di sonde [7-9]. Le interazioni che si instaurano tra il target e le sonde immobilizzate sulla superficie metallica causano, infatti, delle variazioni di indice di rifrazione le cui diverse intensità vengono rappresentate, nell'immagine SPRI, con differenti livelli di grigio. In tempo reale ed in assenza di marcatura possono così ricavarsi informazioni di tipo quali-quantitativo sulla natura delle interazioni in gioco.

Per quanto riguarda la sensibilità, i metodi d'analisi convenzionali basati su SPR non riescono ad operare nel range femtomolare per l'ibridazione di acidi nucleici. Sono stati pertanto profusi sforzi mirati ad individuare nuovi approcci analitici utili ad aumentare la sensibilità del metodo. Sistemi SPR facenti uso di nanoparticelle di oro [10, 11] hanno, ad esempio, permesso la rivelazione dell'ibridazione operando a concentrazioni comprese nel range del picomolare [12, 13], mentre una serie di metodi basati su reazioni enzimatiche si sono dimostrati in grado di rivelare RNA e DNA a concentrazioni dell'ordine del femtomolare [14, 15].

Recenti e più affascinanti opportunità nel riconoscimento degli acidi nucleici, derivano dalla possibilità di riconoscere piccole variazioni di sequenze di basi a volte presenti come sostituzioni di un singolo nucleotide [16-18]. A tale scopo sono state individuate sonde alternative al DNA in grado di determinare condizioni di alta selettività di sequenza capaci, cioè, di ridurre al minimo le reazioni di ibridazione non specifiche. Le sonde ad acidi peptidonucleici (PNA) [19] si sono rivelate, in tale senso, particolarmente efficienti [20, 21]. Il PNA è un analogo del DNA in cui lo scheletro zucchero-fosfato è sostituito da una sequenza di unità neutre di N-(2-amminoetil)glicina.

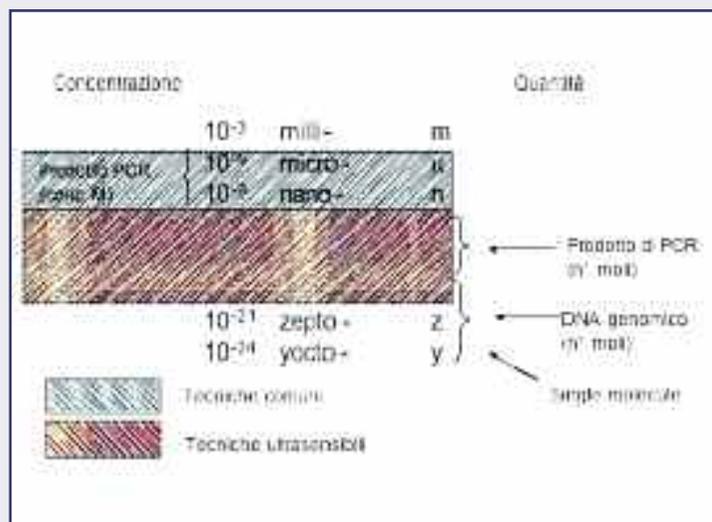
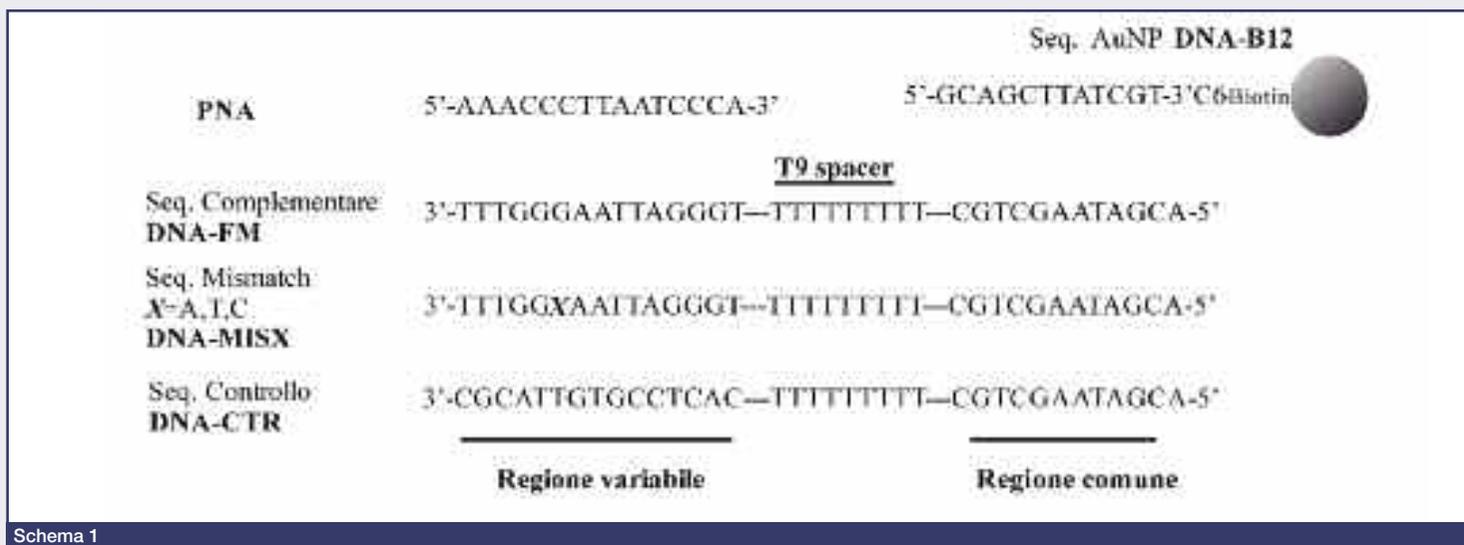


Fig. 1 - Tipici intervalli di concentrazione per analisi di DNA dopo PCR o "PCR-free"

Le particolari caratteristiche strutturali e le capacità di riconoscimento fanno sì che il PNA-sonda immobilizzato sulla superficie di un biosensore manifesti una talmente elevata specificità di sequenza [22] da consentire la rivelazione di un singolo mismatch nella sequenza target. Inoltre, di non secondaria importanza appare la più ampia libertà nella scelta delle condizioni sperimentali necessarie per l'instaurarsi delle reazioni di ibridazione [23-26].

Nel caso qui descritto, una sonda di PNA (realizzata per riconoscere il costrutto della soia geneticamente modificata), è stata presa a modello per valutare la capacità di riconoscimento di oligonucleotidi contenenti la sequenza complementare e per la discriminazione di oligonucleotidi recanti sostituzioni di singolo nucleotide.

La rivelazione dell'avvenuta ibridazione mediante SPRI [27] avviene, in maniera indiretta, a seguito dell'uso di nanoparticelle di oro opportunamente funzionalizzate e con elevata sensibilità (fM), mentre l'uso combinato di SPRI e di sistemi microfluidici per il controllo dei fluidi consente un consumo di quantità di target nell'ordine delle zeptomoli.



Schema 1

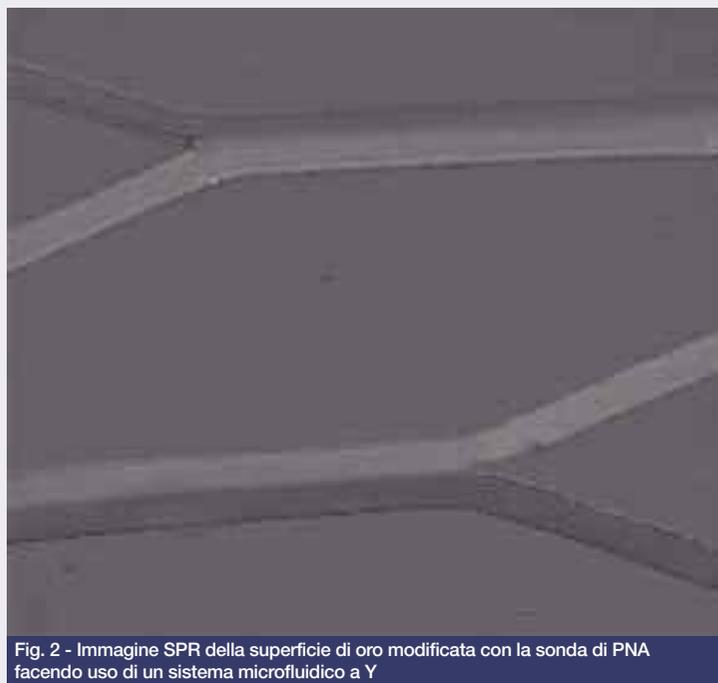
Ancoraggio spazialmente controllato di PNA

La sequenza della sonda di PNA (riportata nello Schema 1 assieme alle sequenze ed agli acronimi degli oligonucleotidi utilizzati nel corso del lavoro), come già riportato [2], è stata progettata in modo da massimizzare l'efficienza nella reazione di ibridazione. È comunque da notare come la formazione di strutture secondarie in sonde immobilizzate su superfici abbia un effetto non particolarmente limitante rispetto alle reazioni di ibridazione [28, 29]. Un adeguato allontanamento della sonda dalla superficie metallica è stato ottenuto introducendo due gruppi spaziatori di acido 2-(2-amminoetossi) etossiacetico (AEEA) [30].

L'ancoraggio spazialmente controllato della sonda sulla superficie del sensore SPRI è stato ottenuto facendo uso di opportuni dispositivi microfluidici in poli-dimetilsilossano (PDMS) realizzati mediante una procedura non fotolitografia a replica di stampo [31]. In particolare, per realizzare i suddetti dispositivi microfluidici sono state create delle microstrutture in rilievo (larghezza 200 μm , altezza 80 μm , lunghezza 16 mm) su un supporto in polivinilcloruro.

Su questo stampo viene fatto polimerizzare il PDMS in modo da ottenere un dispositivo che riproduce in negativo la struttura in rilievo dello stampo, così da ottenere un sistema di microcanali, ciascuno dal volume interno inferiore a 0,2 μL .

La densità di superficie della sonda immobilizzata è decisiva per l'ottenimento di un'efficiente reazione di ibridazione sulla superficie [32, 33]. Infatti da questo parametro dipendono sia la velocità di cattura del target che l'esito della reazione di ibridazione. Un'opportuna densità di superficie è richiesta per minimizzare eventuali effetti associati all'ingombro sterico dei sistemi coinvolti [34] oltre



che quelli derivanti da interazioni elettrostatiche repulsive [35] che possono instaurarsi tra le molecole del target. Tali effetti, nel caso di superfici più densamente impaccate, determinano un abbattimento della sensibilità nella rivelazione dell'ibridazione [36].

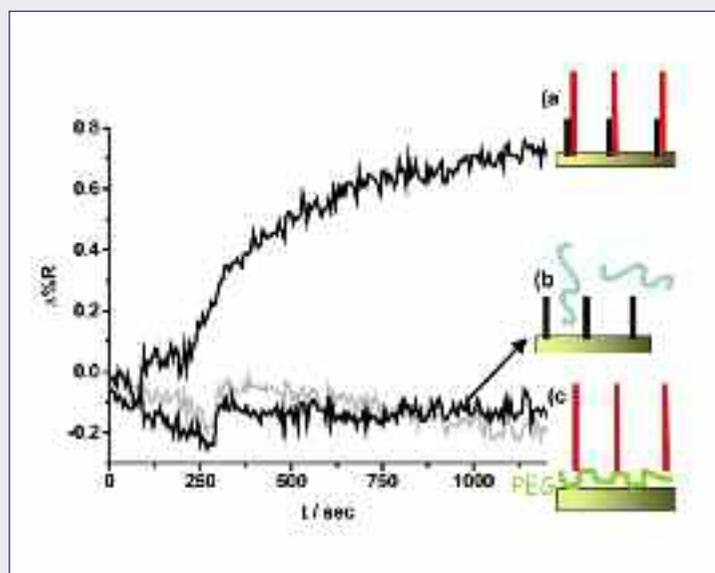
Gli esperimenti sono stati quindi condotti mantenendo una densità di superficie di molecole di PNA pari a 3×10^{12} molecole cm^{-2} . Tale valore risulta ottimale anche in relazione ai valori riportati in letteratura [37].

La Fig. 2 mostra un'immagine SPR da cui è evidente l'esito dell'ancoraggio spazialmente risolto della sonda di PNA avvenuto in corrispondenza della regione più scura del microcanale (concentrazione PNA 0,1 μM in PBS; velocità del flusso 5 $\mu\text{L min}^{-1}$). La regione più chiara del microcanale è stata ottenuta a seguito dell'immobilizzazione di poli-etilenglicole (4 mM mPEG-NH₂ in 0,5 M TEA).

Rivelazione diretta della sequenza di DNA target e discriminazione della sequenza controllo

La capacità di rivelare mediante SPRI l'ibridazione diretta tra la sonda di PNA e l'oligonucleotide complementare è stata inizialmente valutata studiando l'interazione con la sonda di PNA di due sequenze oligonucleotidiche 36-mer aventi la prima (DNA-FM) un tratto complementare alla sequenza della sonda e la seconda (DNA-CTR) totalmente non complementare.

In Fig. 3 si mostrano le variazioni di percentuale di riflettività ($\Delta\%R$) osservate nel corso del passaggio delle due soluzioni di oligonucleotidi (Fig. 3a e 3b, rispettivamente). In particolare si può notare come in seguito all'adsorbimento diretto del DNA-FM (Fig. 3a:



concentrazione 1 μM in PBS; velocità di flusso $5\mu\text{L min}^{-1}$; volume della soluzione di campione utilizzato 150 μL) si sia registrata una $\Delta\%R$ pari a circa 0,7. È anche da notare come il segnale risulti significativamente diverso da quello registrato in conseguenza all'adsorbimento della sequenza DNA-CTR (Fig. 3b). Quest'ultimo risulta pressoché sovrapposto al segnale ottenuto a seguito dell'adsorbimento non specifico della sequenza DNA-FM su una superficie priva della sonda di PNA e funzionalizzata solo con PEG (Fig. 3c).

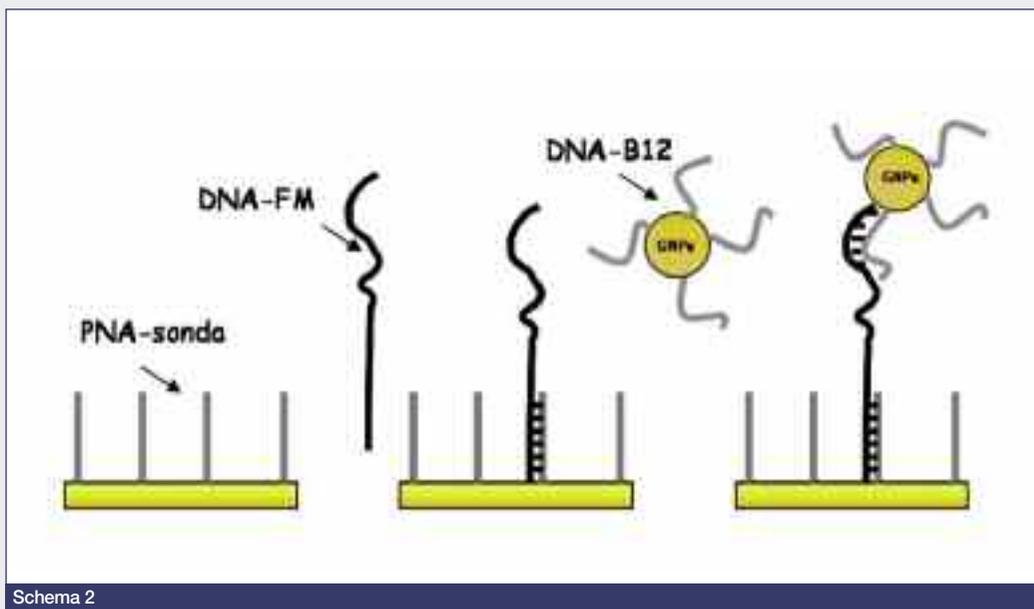
La bassa intensità del segnale SPRI costituisce un evidente limite nella

rivelazione diretta della reazione di ibridazione di oligonucleotidi target a concentrazioni inferiori a micromolare. D'altra parte l'eliminazione fortemente auspicabile del processo di amplificazione del target mediante PCR impone un significativo innalzamento della sensibilità nella rivelazione. Risulta, quindi, evidente come sia indispensabile mettere a punto un strategia mirata all'amplificazione del segnale SPRI derivante dall'ibridazione selettiva del PNA con l'oligonucleotide target.

Rivelazione indiretta della sequenza di DNA target e discriminazione delle sequenze mismatched

In conseguenza alla bassa sensibilità riscontrata nella rivelazione diretta con SPRI della ibridazione tra PNA e DNA si sono investigate le potenzialità offerte da un approccio basato su una rivelazione indiretta della ibridazione. Tale approccio ha visto l'uso di nanoparticelle di oro (AuNP) opportunamente funzionalizzate ed è stato basato sulla strategia a sandwich rappresentata nello Schema 2.

Le nanoparticelle di oro sono state preparate in accordo ai metodi riportati in letteratura [38], per riduzione, con sodio citrato, dell'acido tetracloroaurico e caratterizzate con spettroscopia UV-vis [39] e microscopia TEM. Sono state quindi funzionalizzate [40] con streptavidina e, quindi, coniugate con una sequenza di un oligonucleotide 12-mer biotinilato all'estremità 3'(DNA-B12) e complementare ad un tratto delle sequenze dell'oligonucleotide complementare al PNA (DNA-FM) e di controllo (DNA-CTR). Il suddetto tratto non è coinvolto nella reazione di ibridazione con la sonda di PNA. Per condurre gli esperimenti di ibridazione, la concentrazione delle soluzioni degli oligonucleotidi target e controllo è stata variata in un intervallo compreso tra 1 μM ed 1 fM. Una soluzione avente una concentrazione pari a 10 nM (tale concentrazione è



Schema 2

stata mantenuta per tutti gli esperimenti condotti) di nanoparticelle coniugate al DNA-B12 è stata posta a contatto con la superficie di PNA dopo il passaggio dell'oligonucleotide complementare (DNA-FM) o di controllo (DNA-CTR).

L'esposizione della superficie così trattata alla soluzione di nanoparticelle ha permesso la rivelazione indiretta dell'ibridazione specifica avvenuta tra il PNA ed il DNA-FM, registrando un segnale chiaramente distinguibile da quello fornito dalla sequenza controllo, oltre che dal segnale derivante dalle interazioni aspecifiche delle nanoparticelle funzionalizzate sulla superficie. A titolo dimostrativo si riporta in Fig. 4 la variazione di riflettività percentuale rilevata per i tre esperimenti summenzionati quando le soluzioni dell'oligonucleotide complementare (Fig. 4a) e di controllo (Fig. 4b) venivano fatte fluire ad una concentrazione pari a 10 pM.

I risultati ottenuti con l'approccio adottato, che combina l'amplificazione del segnale SPRI con la più alta capacità del PNA, in termini di sensibilità, specificità e stabilità, di ibridare le sequenze complementari, ci hanno spinti ad investigare ulteriormente le potenzialità dell'approccio nella discriminazione di mismatch di singola base. Prendendo in considerazione la sostituzione di un singolo nucleotide della sequenza DNA-FM, si è constatato come, utilizzando l'approccio prima descritto, fosse possibile ottenere la discriminazione dell'oligonucleotide avente la sequenza perfettamente complementare al PNA immobilizzato e degli oligonucleotidi aventi un singolo mismatch (DNA-MISX). I risultati in termini di risposta SPRI ottenuti utilizzando 150 μL di soluzioni a concentrazione 1 fM (150 zeptomoli in totale) di oligonucleotide complementare, oligonucleotidi aventi un singolo mismatch e oligonucleotide di controllo vengono raffigurati in Fig. 5 dove si mostra anche un'immagine SPR differenza acquisita contemporaneamente all'introduzione delle nanoparticelle che illustra la rivelazione parallela

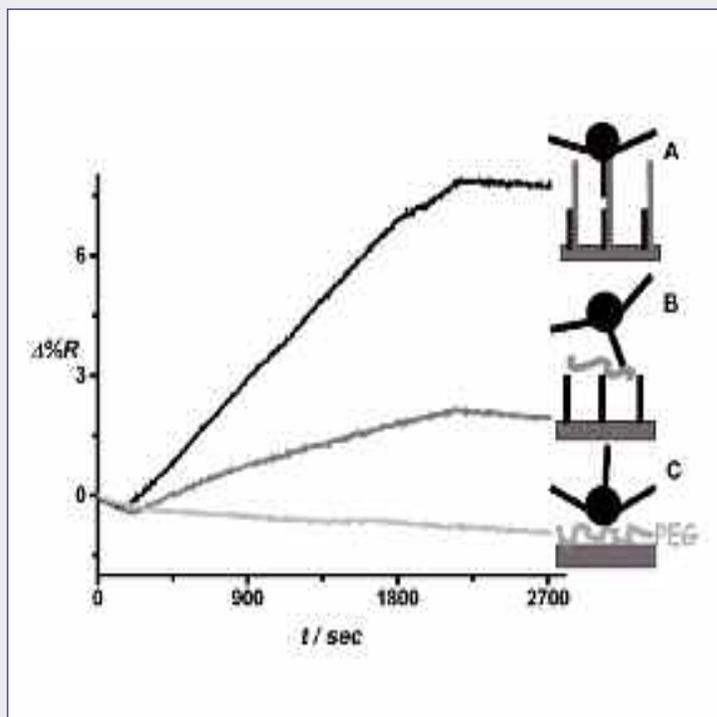


Fig. 4 - Dipendenza temporale del segnale SPRI ottenuto a seguito dell'adsorbimento delle nanoparticelle funzionalizzate con DNA-B12 su a) DNA-FM ibridato con il PNA immobilizzato sulla superficie, b) DNA-CTR adsorbito sul PNA immobilizzato sulla superficie e c) su una superficie modificata con poli-etilenglicole. La concentrazione delle soluzioni di DNA-FM e DNA-CTR usate per questi esperimenti è 10 pM

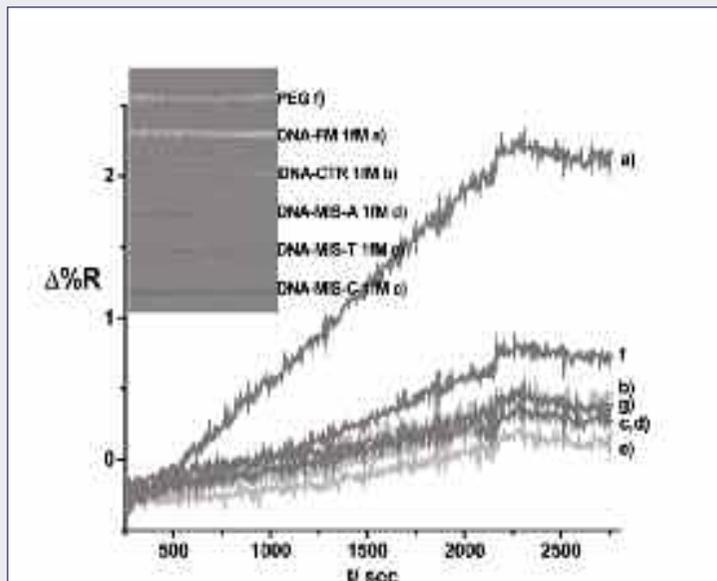


Fig. 5 - Dipendenza temporale del segnale SPRI ottenuto a seguito dell'adsorbimento delle nanoparticelle funzionalizzate con DNA-B12 su a) DNA-FM (1 fM) ibridato con il PNA immobilizzato sulla superficie, b) DNA-CTR (1 fM), c) DNA-MIS-C (1 fM), d) DNA-MIS-A (1 fM), e) DNA-MIS-T (1 fM) adsorbiti sul PNA immobilizzato sulla superficie, f) DNA-FM (1 fM) adsorbito su una superficie modificata con poli-etilenglicole e g) su una superficie di PNA. Una immagine SPR differenza mostra la rivelazione parallela delle risposte SPRI sopra menzionate

delle risposte. Risulta evidente la luminosità più chiara in corrispondenza al microcanale dove è avvenuta l'ibridazione selettiva con il target rispetto ai microcanali nei quali l'amplificazione del segnale con le nanoparticelle mostra, per le sequenze mismatched, una variazione di riflettività paragonabile a quella registrata in assenza di target.

La variazione del segnale SPRI al variare della concentrazione del DNA-FM ($\Delta\%R_{\text{match}}$) è mostrata in Fig. 6 dove si riporta, per confronto, anche la variazione di segnale generata nel caso delle sequenze mismatched ($\Delta\%R_{\text{mismatch}}$, si riporta il valore medio osservato per le differenti sequenze mismatched). L'analisi statistica dei dati ci permette di affermare che i segnali generati nel caso della sequenza complementare e quelli ottenuti con le sequenze mismatched risultano differenti. Considerando il rapporto $\Delta\%R_{\text{match}}/\Delta\%R_{\text{mismatch}}$ (Fig. 7) per i differenti valori di concentrazione si riscontra un valore medio del rapporto centrato attorno a 3,6, per il range di concentrazione 1 μM - 1 pM, mentre si osserva un incremento del valore medio del rapporto nel range 500 fM - 1 fM. In particolare, alla più bassa concentrazione investigata (1 fM) si realizzano le condizioni migliori per discriminare sostituzioni di un singolo nucleotide. Ad una tale concentrazione infatti, il segnale specifico derivante dall'amplificazione con nanoparticelle della ibridazione selettiva si abbassa, ma nel contempo il segnale proprio delle sequenze mismatched si riduce al livello del segnale di background ottenuto in assenza di DNA, aumentando in tal modo le capacità discriminative.

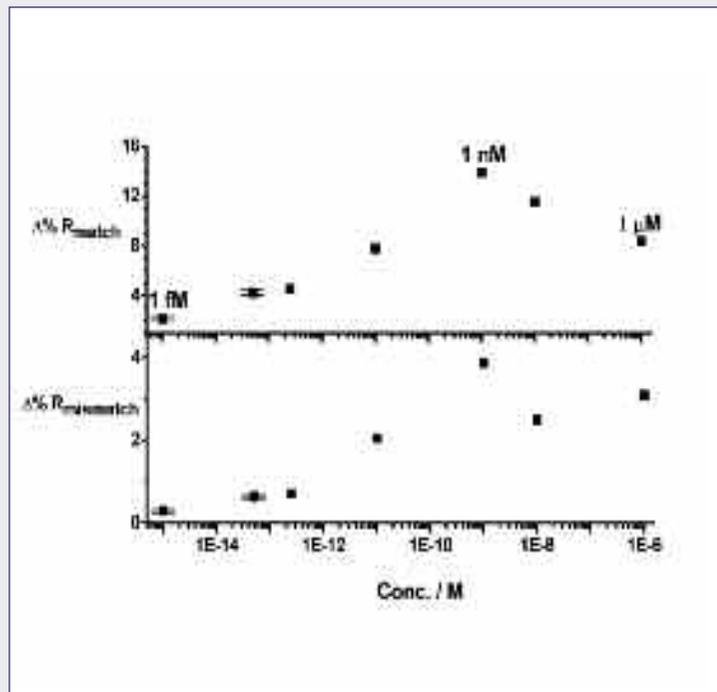


Fig. 6 - Andamento del segnale medio SPRI ($\Delta\%R$) ottenuto dopo il passaggio delle nanoparticelle funzionalizzate in funzione della concentrazione delle sequenze target ($\Delta\%R_{\text{match}}$) e controllo ($\Delta\%R_{\text{mismatch}}$) utilizzate

Le concentrazioni di DNA target investigate con l'approccio descritto risultano adeguate per la rivelazione di campioni di DNA non sottoposti a laboriose procedure di amplificazione e di introduzione di marcatori fluorescenti.

In particolare la strategia qui utilizzata si inserisce fra le tecniche ultrasensibili potenzialmente in grado di dare rivelazione PCR-free, di cui al momento esistono pochi esempi in letteratura [41, 42]. Inoltre il ricorso alla microfluidica ed a sistemi miniaturizzati pone le basi per lo sviluppo di metodi rapidi ed efficienti, in grado di rivelare, con i vantaggi sopra descritti, campioni di DNA in campioni geneticamente modificati o di importanza biomedica.

Ringraziamenti: Si ringraziano il MIUR (PRIN 2005 n 2005038704) ed il MIPAAF (RIOM project) per il parziale supporto finanziario.

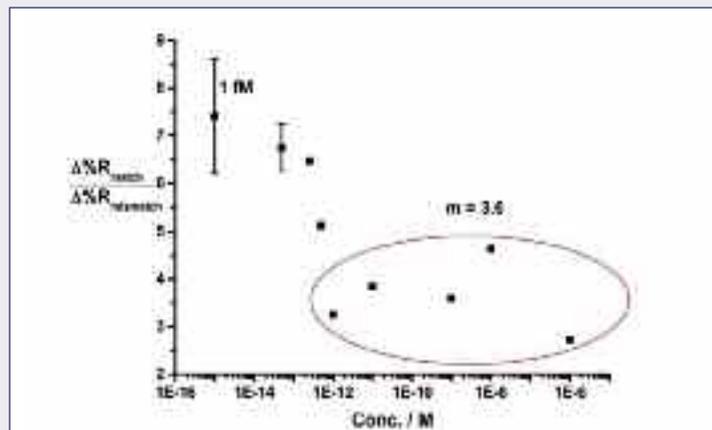


Fig. 7 - Andamento del rapporto tra $\Delta\%R_{\text{match}}$ e $\Delta\%R_{\text{mismatch}}$ in funzione della concentrazione delle sequenze target

Bibliografia

- [1] A. Sassolas *et al.*, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 109.
- [2] A. Germini *et al.*, *J Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 3958.
- [3] V. Kumar Khanna, *Biotechnology Advances*, 2005, **25**, 85.
- [4] J.D. Hoheisel, *Nat. Rev. Gen.*, 2006, **7**, 200.
- [5] J. Wang, *Small*, 2005, **1**, 1036.
- [6] B. Rothenhäusler, W. Knoll, *Nature*, 1988, **332**, 615.
- [7] L.K. Wolf *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 10503.
- [8] H.J. Lee *et al.*, *Langmuir*, 2006, **22**, 5241.
- [9] R. D'Agata *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 610.
- [10] T.A. Taton *et al.*, *Science*, 2000, **289**, 1757.
- [11] S. Fang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 14044.
- [12] K. End *et al.*, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 6976.
- [13] D.K. Kim *et al.*, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 1855.
- [14] A.W. Wark *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 644.
- [15] T.T. Goodrich *et al.*, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 6173.
- [16] A. Russom *et al.*, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 2220.
- [17] Y.J. Hu *et al.*, *Anal. Biochem.*, 2007, **369**, 54.
- [18] Y. Li *et al.*, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 3158.
- [19] P.E. Nielsen, *Acc. Chem. Res.* 1999, **32**, 624.
- [20] S. Rossi *et al.*, *Eur. Food Res. Technol.*, 2006, **23**, 1.
- [21] F. Totsingan *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 1232.
- [22] P. Nielsen, *Q. Rev. Biophys.*, 2005, **38**, 345.
- [23] J. Wang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 7667.
- [24] Z. Gao *et al.*, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 3291.
- [25] C. Li-Qiang *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 4944.
- [26] J. Liu *et al.*, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 470.
- [27] R. D'Agata *et al.*, *ChemBioChem*, 2008, **9**, 2067.
- [28] Y. Gao *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 2006, **34**, 3370.
- [29] M.M.A. Sekar *et al.*, *Nucleic. Acids Res.*, 2005, **33**, 366.
- [30] S. Rossi *et al.*, *Eur Food Res Technol.*, 2006, **223**, 1.
- [31] G. Whitesides, Y. Xia, *Angew. Chem.*, 1998, **37**, 550.
- [32] D. Yao *et al.*, *Biophysical Journal*, 2005, **88**, 2745.
- [33] T.M. Herne, M. Tarlov, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 8916.
- [34] E. Southern *et al.*, *Nat. Genet.*, 1999, **21**, 5.
- [35] A.W. Peterson *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 14601.
- [36] F. Yu *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2004, **32**, e75.
- [37] A.W. Peterson *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2001, **29**, 5163.
- [38] K.C. Grabar *et al.*, *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 735.
- [39] W. Haiss *et al.*, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 4215.
- [40] L. He *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2000, **122**, 9071.
- [41] M. Minunni *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, **127**, 7966.
- [42] H.A. Ho *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, **127**, 12673.

ABSTRACT

SPRI and Peptide Nucleic Acids: a Combined Approach towards an Ultrasensitive DNA Detection

The use of Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI) and peptide nucleic acid probes is here proposed for the detection of DNA. An ultrasensitive detection of single base mismatches is obtained by means of metallic nanoparticle amplified SPRI. Moreover, the use of microfluidic based strategies is demonstrated to allow SPRI investigations to be carried out with high-throughput and reduced sample volumes.